

Influência do AMP cíclico na regeneração do nervo facial em ratos

Influence of cyclic AMP on facial nerve regeneration in rats

Andrei Borin¹, Ronaldo Nunes Toledo², Paulo Lee Ho³, José Ricardo Gurgel Testa⁴, Oswaldo Laércio Mendonça Cruz⁵, Yotaka Fukuda⁶

Palavras-chave: amp cíclico, histologia, nervo facial, rato, regeneração nervosa.

Keywords: cyclic amp, histology, facial nerve, rat, nerve regeneration.

Resumo / Summary

Estimular a regeneração do nervo facial é ainda hoje um desafio. **Objetivo:** Estudar a possível influência neurotrófica do nucleotídeo cíclico adenosina monofosfato (AMPc) na regeneração do nervo facial de ratos Wistar. **Método:** Trinta e dois animais foram submetidos à transecção completa com sutura imediata do nervo facial direito, sendo divididos em expostos ou não expostos à aplicação tópica de AMPc, com análises comportamentais (movimentação de vibrissas e fechamento da rima palpebral) e histométrica (contagem de fibras mielinizadas) em dois períodos, 14 e 28 dias após a lesão. **Resultado:** Encontramos diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nas análises comportamental e histométrica no 14º dia, sugerindo uma precocidade na regeneração do nervo facial exposto ao AMPc. **Conclusão:** Nosso estudo constatou uma possível ação neurotrófica do AMPc na regeneração do nervo facial em ratos.

Promoting facial nerve regeneration is a significant challenge. **Aim:** To evaluate the possible neurotrophic influence of cyclic AMP on facial nerve regeneration of Wistar rats. **Method:** The right facial nerve of thirty-two animals were completely transected and immediately sutured, followed by exposure or not to topical cyclic AMP. Behavioral and histometric analyses were done at 14 and 28 days. **Results:** Statistical differences ($p < 0.05$) were found in the behavioral and histometric analyses on the 14th day, suggesting an early regenerative response of the facial nerve to cAMP exposure. **Conclusion:** This study demonstrates a possible neurotrophic effect of cAMP on facial nerve regeneration in rats.

¹Mestre em otorrinolaringologia, pós-graduando Doutorado.

²Mestre em otorrinolaringologia, pós-graduando Doutorado.

³Biólogo e doutor em bioquímica, pesquisador científico do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

⁴Doutor em otorrinolaringologia, professor adjunto da disciplina de otorrinolaringologia da UNIFESP/EPM.

⁵Professor livre-docente, professor afiliado da disciplina de otorrinolaringologia da UNIFESP/EPM.

⁶Professor livre-docente, professor da disciplina de otorrinolaringologia da UNIFESP/EPM.

Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo.

Endereço para correspondência: Andrei Borin Rua Loefgreen 1587 apto 152 São Paulo SP 04040-032.

E-mail: andreiborin@hotmail.com

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 18 de abril de 2007. cod. 4460.

Artigo aceito em 4 de agosto de 2007.

INTRODUÇÃO

O famoso livro de anatomia humana Gardner/Gray/O'Rahilly define que a mímica facial é exercida por 22 grupos musculares derivados do segundo arco branquial¹. Todos esses músculos são inervados pela divisão motora do 7º nervo craniano, o facial. A lesão deste nervo acarreta disfunções múltiplas, com impacto cosmético, funcional e psicológico nas pessoas acometidas²⁻⁴.

Já na Segunda Grande Guerra do século XX surgiram as primeiras tentativas de se otimizar a regeneração de nervos submetidos à sutura, com o uso da sulfonamida tópica no sítio de lesão⁵. Em 1951, Levi-Montalcini e Hamburger⁶ observaram que alguns tumores eram capazes de induzir o crescimento exacerbado de nervos periféricos, sugerindo que os mesmos deveriam produzir substâncias endógenas para tal. Desde então, lesões controladas de nervos são utilizadas em paradigmas experimentais para se estudar o efeito de diversos fatores físicos, químicos e biológicos sobre a sua regeneração. Heifti, em 1994, definiu como fatores neurotróficos as proteínas capazes de regular a sobrevivência e a diferenciação de células neurais, o desenvolvimento e a manutenção da integridade do sistema nervoso e a plasticidade neuronal⁷. Atualmente esta definição está sendo ampliada, uma vez que não só proteínas exercem estas funções, mas se reconhecem outras propriedades destes fatores, como a estimulação do crescimento neural, o auxílio na ramificação nervosa, a indução do anabolismo neuronal e a modulação da neurotransmissão e da condutibilidade elétrica⁸.

O nucleotídeo cíclico adenosina monofosfato (AMPC), formado pela adenilato ciclase e degradado pela fosfodiesterase, está presente em todas as células eucariotas⁹, e é considerado hoje a principal molécula que atua como mensageiro intracelular para diversos estímulos celulares^{9,10}. Desde 1955, quando iniciaram-se as pesquisas sobre o efeito do glucagon em hepatócitos¹¹, este nucleotídeo intracelular vem sendo responsabilizado por uma série de eventos, desde o controle do tônus e inotropismo cardíacos¹² até a maturação de células ovarianas e a secreção endócrina de células adrenais⁹. Tem-se também correlacionado esta molécula à resistência ou susceptibilidade de células tumorais a quimioterápicos¹³⁻¹⁵, sendo sua manipulação um dos caminhos promissores para otimizar o tratamento de diversos tipos de neoplasias. Tradicionalmente na cultura hindu, o uso da erva *Coleus forskohlii* é indicado para insônia, convulsão e doenças cardíacas, sendo sua atuação farmacológica explicada através do estímulo da adenilato ciclase¹⁶ pelo alcalóide forskolina presente nesta planta.

Diversos estudos vêm esclarecendo o papel do AMPC no sistema neurológico. Clinicamente, está envolvido no crescimento de tumores como astrocitomas,ependimomas e adenomas hipofisários¹⁷ e na expressão protéica

de neurônios de pacientes com doença de Alzheimer¹⁸, entre outros. Um possível papel neurotrófico do AMPC baseia-se em trabalhos utilizando culturas de células, nos quais foi detectado que este nucleotídeo influencia desde a sobrevivência e diferenciação neuronal de "PC 12 cells"¹⁹⁻²², até a produção de mielina por células de Schwann^{23,24}. Incluem-se também o estabelecimento de sinapses inter-neuronais²⁵ e o nível de atividade de células gliais²⁶. Em animais, parece estar ligado à capacidade de resistência à hipóxia dos neurônios das tartarugas durante mergulhos prolongados²⁷ e também à extrema capacidade de regeneração da medula espinal de peixes²⁸. Em ratos, na década de 70 do século passado, foi testado na recuperação de nervos ciáticos, mas com resultados conflitantes^{29,30}. Na década de 80, novos resultados promissores na recuperação de nervos ciáticos são oferecidos pela literatura^{31,32}. Não encontramos, entretanto, trabalhos na literatura que avaliem a influência do AMPC na regeneração de nervos faciais de mamíferos, sendo nossa proposta de trabalho estudá-la.

MÉTODO

O projeto de pesquisa deste estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de nossa Instituição sob o número 1708/05. Foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 200 e 240g, machos, mantidos em gaiolas adequadas, em sala climatizada e sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimento. Neste estudo foram confeccionados 4 grupos experimentais animais: "AMPC 14D": transecção completa do tronco do nervo facial direito, sutura imediata e exposição do sítio de lesão ao AMPC, com sacrifício em 14 dias; "CTRL 14D": a mesma lesão com exposição a Ringer-lactato (RL) e sacrifício em 14 dias; "AMPC 28D": a mesma lesão com exposição ao AMPC e sacrifício em 28 dias; e "CTRL 28D": a mesma lesão com exposição a RL e sacrifício em 28 dias. A cirurgia inicial para realizar a transecção e sutura do tronco do nervo facial direito obedeceu à descrição do modelo experimental estabelecido por nosso grupo³³. Para a liberação do AMPC junto ao sítio de sutura neural, utilizamos bombas osmóticas (Alzet® Mini-osmotic Pump model 2002) acopladas a cateter próprio de polietileno, com um fluxo de 0,5µl/hora por 14 dias. Estas bombas foram posicionadas no subcutâneo dos animais na região interescapular durante a cirurgia inicial, sendo a ponta do cateter fixado com prolene 7-0 a aproximadamente 2mm da sutura neural. Nos grupos expostos ao AMPC, a solução utilizada foi de dibutiril-AMPC 1mM do sal fabricado pela Sigma® ("N6,2'-O-dibutiryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate") diluído em RL. Nos demais grupos, as bombas foram preenchidas apenas com RL.

Em dias alternados à cirurgia, até completar 14 ou 28 dias de acordo com o grupo em questão, os animais foram submetidos à observação comportamental da mímica

facial, levando-se em conta a movimentação de vibrissas e o fechamento da rima palpebral. As escalas para esta observação se encontram descritas em Borin et al.³³, sendo atribuídos de 0 a 5 pontos para cada quesito, com caráter evolutivo na recuperação dos movimentos.

Após 14 ou 28 dias, os animais foram sacrificados e submetidos a uma nova dissecação do nervo facial direito para a localização da sutura neural prévia, sendo retirado o fragmento distal à sutura para análise histológica. Também se realizou a retirada do tronco do nervo facial contralateral (esquerdo) de todos os ratos, sendo enviados para análise histológica. O material para histologia e obtenção de imagens digitalizadas da microscopia do nervo facial foi processado no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) de nossa Instituição, seguindo protocolo previamente descrito³³. Para a análise histológica qualitativa, as fotos foram dispostas seqüencialmente de acordo com o tempo entre lesão e sacrifício do animal e exposição ou não ao AMPc, sendo observada a presença de fibras mielinizadas, seu diâmetro relativo e a uniformidade de sua distribuição no nervo. Para a análise histológica quantitativa (histométrica), foi adotado o procedimento para a contagem de fibras mielinizadas³³ dos troncos dos nervos faciais direito e esquerdo de cada rato, obtendo ainda a razão direito/esquerdo. Foi avaliada uma área total de 6399,679µm² por nervo estudado.

A análise estatística dos dados baseou-se na combinação de dois eventos: intervenção (droga - administração ou não de AMPc) e tempo (período - 14 ou 28 dias). Foram analisados os dados obtidos para cada grupo quanto à:

- 1) pontuação clínica da movimentação das vibrissas;
- 2) pontuação clínica do fechamento da rima palpebral;
- 3) contagem das fibras do nervo facial esquerdo;
- 4) contagem das fibras do nervo facial direito;
- 5) razão direito/esquerdo da contagem de fibras.

Para a análise comparativa utilizamos o teste de análise de variância (ANOVA), buscando detectar possíveis diferenças nas médias dos grupos, seguido de um teste POST-HOC. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Foram submetidos à cirurgia inicial 32 animais, sendo designados 8 para cada grupo experimental. Com uma semana de pós-operatório, observamos a ocorrência de uma formação tumoral amolecida envolvendo a bomba osmótica de um animal do grupo AMPc, sendo este sacrificado e detectado a presença de um processo inflamatório encapsulado com conteúdo purulento. Descartamos este animal do estudo e submetemos mais um ao procedimento cirúrgico, completando novamente 8 espécimes por grupo. Utilizamos assim, 33 animais neste estudo.

Durante a realização da eutanásia, tivemos a impressão subjetiva de uma maior “fibrose” durante a dissecação do tronco facial direito nos animais do grupo AMPc 14D e AMPc 28D. Além disso, seus nervos aparentemente apresentavam um “maior diâmetro”, sendo estas impressões subjetivas anotadas em suas fichas de observação. Não encontramos dificuldades em localizar o local de sutura epineural realizada anteriormente, retirando com segurança o segmento distal à mesma em todos os animais.

Observação Comportamental

Observamos uma melhora da movimentação das vibrissas e do fechamento da rima palpebral em todos os grupos. As médias (e desvios-padrão) da pontuação clínica estão expressas na Tabela 1, e os Gráficos 1 e 2 são apresentados trazendo o intervalo de confiança da análise. Notamos que, independentemente da exposição ao AMPc, os grupos sacrificados no 28º dia apresentaram resultados superiores aos sacrificados no 14º. Entre os grupos, encontramos superioridade do AMPc 14D em relação ao CTRL 14D no quesito fechamento da rima palpebral, mas não quanto à movimentação de vibrissas.

Tabela 1. Pontuação clínica (média (desvio padrão)).

	AMPc 14D	CTRL 14D	AMPc 28D	CTRL 28D
Movimentação vibrissas	0,946 (0,264)	0,750 (0,148)	1,241 (0,235)	1,321 (0,273)
Fechamento rima palpebral	1,768 (0,540)	1,089 (0,295)	2,295 (0,436)	2,143 (0,589)

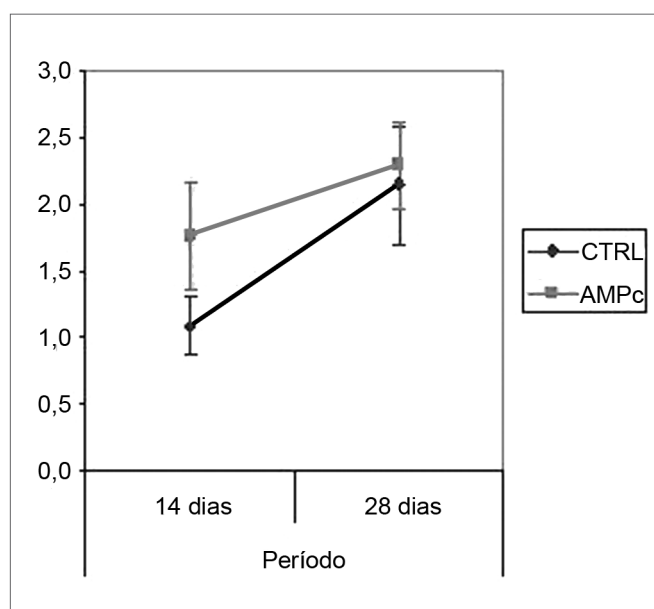


Gráfico 1. Pontuação clínica do fechamento da rima palpebral. Intervalo de confiança para a média: média ± 1,96 * desvio-padrão / √ (n-1)

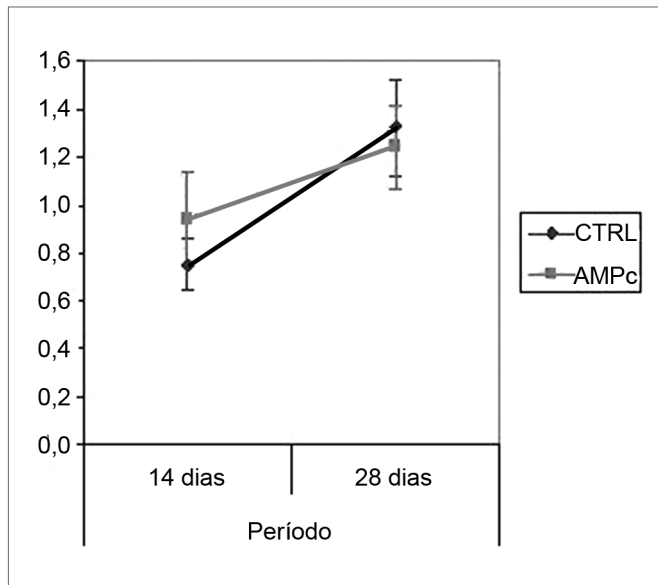


Gráfico 2. Pontuação clínica da movimentação de vibrissas. Intervalo de confiança para a média: média \pm 1,96 * desvio-padrão / $\sqrt{(n-1)}$

Análise Histológica Qualitativa

Obtivemos um total de 64 imagens, correspondentes aos nervos faciais direito e esquerdo de cada um dos 8 animais de cada grupo. Comparando as imagens correspondentes ao nervo facial esquerdo (sem lesão) de todos os grupos, não notamos diferenças entre elas. Apresentaram distribuição uniforme e homogênea de fibras mielinizadas por toda a imagem, como ilustrado na Figura 1.

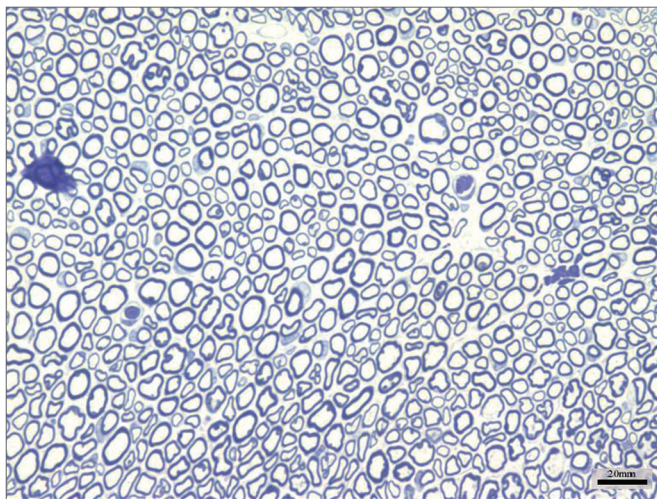


Figura 1. Padrão típico do nervo facial esquerdo (SEM LESÃO) em todos os grupos.

Nos grupos CTRL 14D e AMPc 14D, observando as imagens correspondentes ao nervo facial direito (lado lesado), notamos a presença de pequenas fibras mielinizadas, de diâmetro muito inferior quando comparadas à

respectiva imagem contralateral, muitas vezes agrupadas e não distribuídas uniformemente pela imagem. Este aspecto nos pareceu um pouco mais evidente em alguns animais que em outros, sendo também mais presente no grupo AMPc 14D que no CTRL 14D. Apresentamos as Figuras 2 e 3, correspondentes a cada um destes grupos, respectivamente.

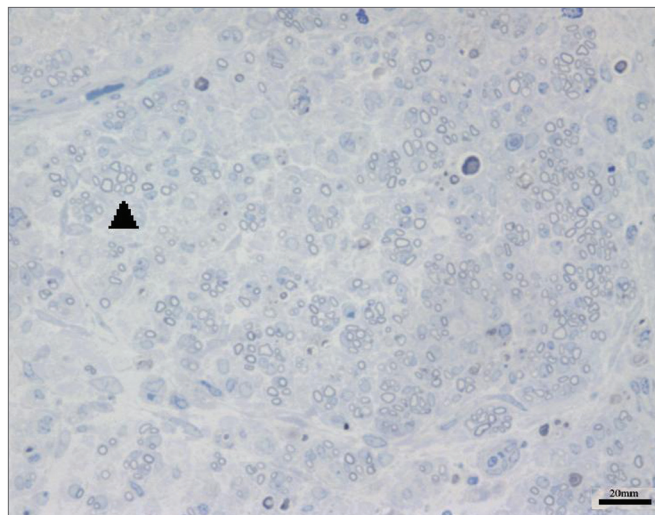


Figura 2. Aspecto típico do nervo facial direito do grupo AMPc 14D. Cabeça de seta exemplificando agrupamento de pequenas fibras mielinizadas

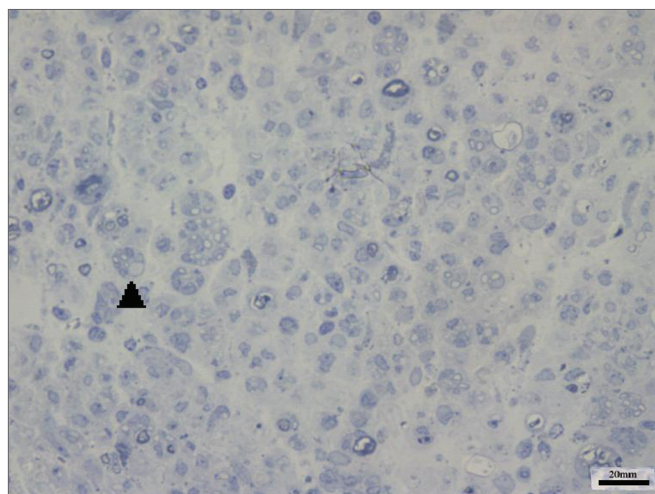


Figura 3. Aspecto típico do nervo facial direito do grupo CTRL 14D. Cabeça de seta exemplificando agrupamento de pequenas fibras mielinizadas

Nos grupos AMPc 28D e CTRL 28D, observadas as imagens correspondentes ao nervo facial direito, notamos um maior número destas pequenas fibras mielinizadas, já não tanto agrupadas, mas ainda variando entre os animais de cada grupo. Notamos ainda a presença de fibras de

maior diâmetro, que se assemelhavam mais às do nervo esquerdo. Apresentamos as Figuras 4 e 5, correspondentes a cada um destes grupos respectivamente.

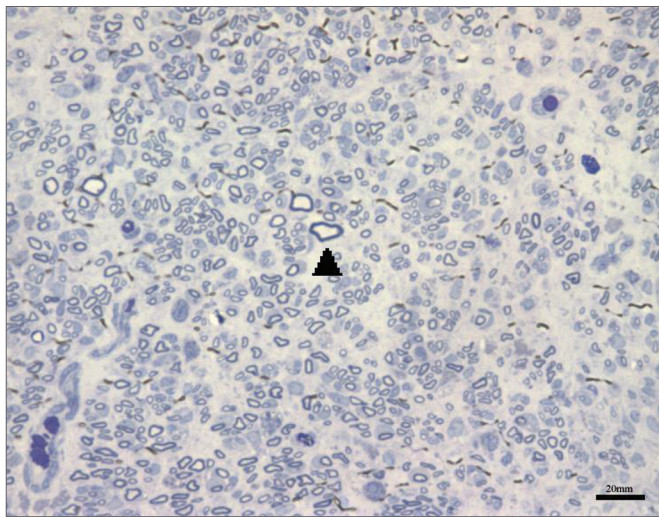


Figura 4. Aspecto típico do nervo facial direito do grupo AMPc 28D. Cabeça de seta exemplificando fibra mielinizada de maior diâmetro

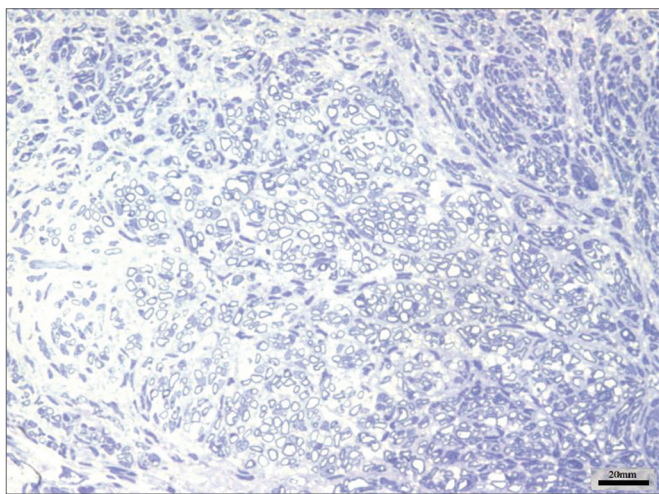


Figura 5. Aspecto típico do nervo facial direito do grupo CTRL 28D

Análise Histológica Quantitativa (Histométrica)

As médias (e desvios-padrão) referentes às contagens de fibras dos nervos esquerdo e direito e à razão direito/esquerdo são apresentadas na Tabela 2, bem como sua análise comparativa nos Gráficos 3 a 5. A contagem dos nervos faciais esquerdos (sem lesão) não variou entre os quatro grupos. A contagem dos nervos direitos (lesão), bem como a razão direito/esquerdo foi maior no 28º dia em comparação ao 14º independentemente da presença da “droga”, indicando uma regeneração ao longo do período. Quando analisamos a presença da droga em 14 dias, foi maior no grupo AMPc 14D ($32,6 \pm 24,2$) em comparação ao

Tabela 2. Contagem de fibras mielinizadas (média (desvio padrão)).

	AMPc 14D	CTRL 14D	AMPc 28D	CTRL 28D
Nervo facial esquerdo	110,375 (23,360)	104,750 (19,667)	110,125 (11,457)	98,625 (14,232)
Nervo facial direito	32,625 (24,160)	9,375 (11,488)	92,125 (13,021)	123,250 (16,816)
Razão direito/esquerdo (%)	30,603 (24,090)	9,695 (11,913)	84,590 (15,472)	127,531 (26,981)

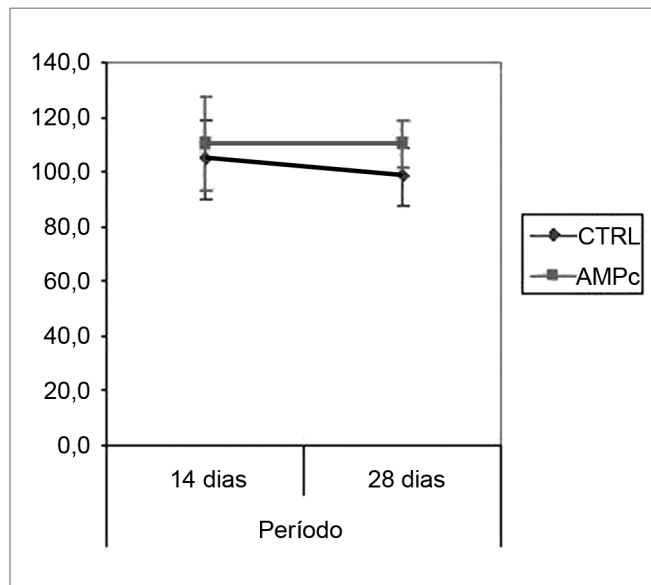


Gráfico 3. Contagem de fibras do nervo facial esquerdo. Intervalo de confiança para a média: média \pm 1,96 * desvio-padrão / $\sqrt{(n-1)}$

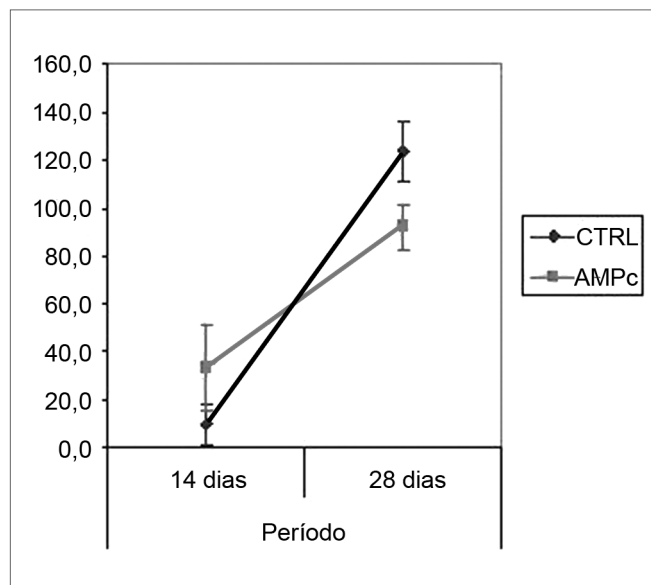


Gráfico 4. Contagem de fibras do nervo facial direito. Intervalo de confiança para a média: média \pm 1,96 * desvio-padrão / $\sqrt{(n-1)}$

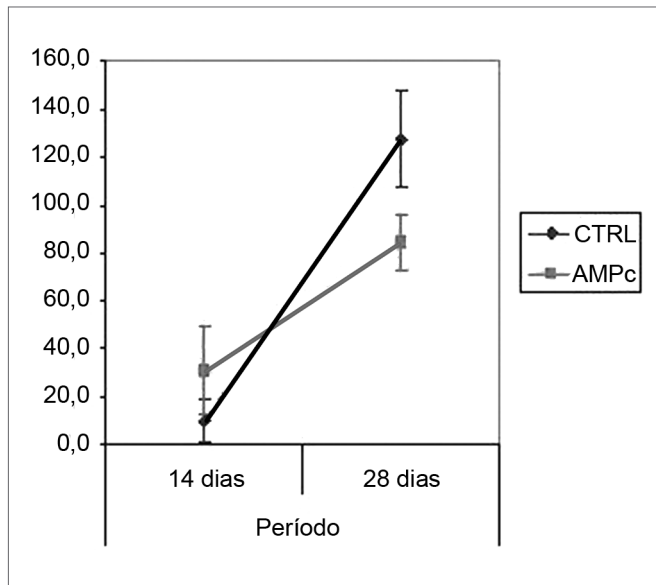


Gráfico 5. Razão direito/esquerdo da contagem de fibras. Intervalo de confiança para a média: média \pm 1,96 * desvio-padrão / $\sqrt{(n-1)}$

CTRL 14D (9,4 \pm 11,5), com uma razão direito/esquerdo de 31% x 9,7%. Já em 28 dias, foi maior no CTRL 28D (123,2 \pm 16,8) que no AMPc 28D (92,1 \pm 13,0).

DISCUSSÃO

Em 1972, Appenzeller e Palmer³⁴ identificaram o aumento endógeno do AMPc em nervos durante o processo de regeneração. A partir de então, diversos autores aventaram um possível papel neurotrófico da administração de AMPc baseado em evidências experimentais “in vitro” (cultura celular)²³⁻²⁵. Estudos sobre a influência do AMPc na regeneração do nervo ciático de roedores mostraram resultados variáveis, constatando-se uma ação estimulante em alguns^{29,31} e ausência do mesmo em outros^{30,35}. Muito desse aparente conflito entre trabalhos pode ser explicado pela metodologia utilizada. O modelo utilizado nestes trabalhos, o do esmagamento do nervo ciático, é, a nosso ver, não homogêneo em relação à lesão, pois o tempo de esmagamento variou de 2 a 30 segundos e não se mensurou a “pressão” utilizada para tanto. O tempo de análise dos resultados também variou, sendo notada uma resposta positiva nos trabalhos de Pichero et al.²⁹ e Gershenbaum e Roisen³¹ após o 12º dia, enquanto os trabalhos de McQuarrie et al.³⁰ e Black e Lasek³⁵, foram encerrados mais precocemente (9 e 8 dias respectivamente), sem a constatação de efeitos neurotróficos.

Em 1984, Kilmer e Carlsen³⁶ realizaram a aplicação tópica de “forskolin”, um estimulador da adenilato ciclase que promove aumentos endógenos de AMPc, com resultados positivos na regeneração do nervo ciático de rã. Já em 1987, os mesmos autores, trabalhando com nervos ciáticos de hamster, propuseram a entrega do AMPc por

“pellets” no local da lesão neural, encontrando resultados promissores³². Estudos sobre a influência da administração exógena de AMPc devem garantir a penetração desta substância na célula, já que a mesma não possui receptores extracelulares, sendo exclusivamente de ação intracelular³⁷. Os análogos dibutilil-AMPc e 8-bromo-AMPc são permeáveis à membrana plasmática e se mostram também menos susceptíveis à ação das fosfodiesterases, tendo uma ação mais evidente que o nucleotídeo natural^{13,38}. Consideramos como preferencial a administração tópica de fatores de crescimento já que em um possível uso futuro em humanos, utilizaríamos uma dose menor do que no seu uso sistêmico, tendo assim um menor risco de efeitos colaterais⁴. Além disso, diversos fatores neurotróficos apresentam ação em outros grupos celulares, o que poderia hipoteticamente estimular o desenvolvimento de tumores quando utilizado sistemicamente, dúvida em muito semelhante ao que acontece na reposição hormonal estrogênica em pacientes com antecedente familiar de câncer de mama. Como outra vantagem para a aplicação tópica, podemos utilizar o nervo contralateral como controle do lado lesado em estudos experimentais^{4,39}.

Na definição de nossa metodologia, optamos por realizar a transecção completa e sutura do nervo por se tratar de uma lesão mais reprodutível, já que esta é sempre grau V na classificação de Suderland^{39,40}, sendo ainda aquela que reproduz melhor a correção cirúrgica realizada em nervos de seres humanos⁴¹. Optamos também pela entrega tópica de dibutilil-AMPc pelos motivos acima. Além disto, escolhemos estender nosso trabalho em até 28 dias para garantir uma avaliação mais confiável, e também associar as avaliações comportamentais e histológicas para aumentar a objetividade do mesmo. Uma discussão mais profunda sobre a metodologia adotada pelo nosso grupo de estudo se encontra em Borin et al.³³. Porém, como crítica, devemos assumir que nossa sutura representa mais uma aproximação dos cotos neurais que uma sutura epineural microcirúrgica clássica, pela impossibilidade técnica de realizar mais que um ponto no nervo facial dos ratos.

Nossa análise comportamental demonstrou uma recuperação funcional acelerada pelo AMPc quanto ao fechamento da rima palpebral, mas não da movimentação de vibrissas, no 14º dia, sendo este efeito não detectado quando analisados nos animais no 28º dia. Essa observação coaduna com a de outros autores que ressaltam ser o retorno parcial do “blink reflex” o sinal mais precoce de recuperação do nervo facial em roedores⁴². Komura et al., 1999⁴, pesquisando o efeito do “brain-derived neurotropic factor” (BDNF) na regeneração do nervo facial do rato, vivenciaram uma situação muito semelhante na qual o fator em questão teve um efeito na precocidade da recuperação clínica nos primeiros 14 dias, desaparecendo esta diferença com 23 dias. Assim, parece-nos que o AMPc poderia estimular a precocidade da recuperação, mas não

seus resultados finais funcionais, fato que voltaremos a discutir quando abordarmos nossos resultados histológicos. Além disto, é inegável que nossa análise de mímica facial em ratos apresenta uma série de limitações quanto à percepção de nuances de expressões quando comparadas às escalas utilizadas na prática clínica em humanos. Perdemos assim a capacidade de detectar diferenças mais sutis em momentos mais avançados de recuperação da motricidade da face dos ratos.

Poderíamos estranhar que em tão pouco tempo nossos animais já demonstravam movimentação facial. Em nosso estudo metodológico piloto³³, já havíamos detectado um retorno de aproximadamente 35% da função facial em 3 semanas e de 60% em 5 semanas. Komura et al.⁴ também notaram esta recuperação precoce (14 dias) após a transecção completa e sutura de nervos faciais de ratos, e ainda Gershbaum e Roisen³¹ ficaram surpresos com o fato do nervo ciático de ratos demonstrar atividade clínica após 2 a 3 dias da lesão. Isto poderia representar uma “inervação cruzada” diferente da anatomia humana, refletida na atividade do núcleo facial contralateral como sugerido por alguns autores⁴³⁻⁴⁵ e/ou uma taxa de regeneração acentuadamente maior no rato que no homem, como sugerido por outros³¹.

A contagem de fibras do nervo facial esquerdo (lado não lesado) não variou significativamente nos quatro grupos deste experimento. Isto confirma não só os achados que descrevem a não variabilidade deste critério inter-espécimes, mesmo de pesos e idades diferentes⁴⁶, como também a possibilidade de utilizar as amostras do lado não lesado como controle do lado lesado em experimentos de regeneração neural^{39,47,48}. Os dados referentes à contagem de fibras mielinizadas do nervo facial direito (lado lesado) no 14º dia demonstraram um aumento significativo da mesma no grupo AMPc quando comparado com o controle, fato este confirmado pelas análises da razão direito/esquerdo. Aparentemente, o AMPc estimulou um início precoce da regeneração neural, acelerando o brotamento axonal a partir do coto proximal. Isto baseado não só na superioridade numérica de fibras encontradas, mas também no aspecto descrito em nossa análise qualitativa da histologia, onde encontramos grupamentos de finas fibras em “blocos”, um aspecto que pode corresponder ao corte transversal de “botões de crescimento neurais”, constituídos de pequenas fibras imaturas descritos por outros autores^{30,49-51}. Através de microscopia eletrônica, Gershbaum e Roisen³¹, descreveram que em modelo de nervo ciático de ratos, o AMPc acelerou o início da degeneração Walleriana no 3º dia pós lesão e também descreveram uma superioridade numérica na contagem de fibras no 10º dia no grupo exposto ao fator quando comparado com salina.

Diversos autores aventam inúmeros mecanismos através dos quais o AMPc tóxico e sistêmico poderia ter

uma ação estimuladora na regeneração neural, porém esta se mantém incerta^{31,32}. Influências na expressão gênica^{14,27} e no citoesqueleto^{36,38} de diversos grupos celulares envolvidos em regeneração neural já se encontram demonstrados. Acredita-se que o nucleotídeo poderia estimular as populações neuronais em si e também as de “suporte”, como a microglia, macrófagos e células de Schwann²³⁻²⁶. Promoveria assim a “limpeza” do sítio de lesão removendo restos celulares, aceleraria a degeneração Walleriana, a mielinização e também o botão de crescimento neuronal, por ação no núcleo celular do neurônio e/ou no sítio de lesão^{31,32,34,36}. Nosso estudo não abrangeu a investigação do mecanismo de ação do AMPc e com isso aceitamos as suposições destes autores.

No 28º dia encontramos uma inversão do achado histométrico anterior, onde a contagem do grupo controle suplantou o grupo exposto ao nucleotídeo, e também ao próprio lado contralateral (razão direito/esquerdo 127%). Este resultado aparentemente conflitante pode ser explicado por diversas hipóteses. Em nosso desenho experimental, o AMPc foi “entregue” pela bomba osmótica apenas nos primeiros 14 dias, ficando as duas semanas seguintes sem ação. Isto poderia sugerir que a ação neurotrófica do nucleotídeo seria garantida apenas na presença do mesmo, desaparecendo no período seguinte, e gerando até uma perda daquelas fibras inicialmente “hiperestimuladas”. Além disto, outros autores defendem que o brotamento seria estimulado por fatores locais como o AMPc, enquanto o alongamento axonal seria dependente de mudanças metabólicas no corpo nuclear do neurônio, e que por isso uma entrega tópica poderia perder o efeito no decorrer do tempo³². Quanto ao fato de a contagem do lado direito suplantou a do lado esquerdo no grupo CTRL 28D, McQuarrie et al.³⁰ encontraram que, após a lesão unilateral do nervo ciático, a contagem de fibras do lado lesado suplantou em 40% a do lado não lesado, atribuindo o fato à ocorrência de um múltiplo brotamento a partir de um único axônio do coto proximal. Isto também foi constatado por Byers et al.⁵² em estudo de regeneração do nervo facial em ratos.

Em culturas celulares, os fatores neurotróficos podem induzir uma diferenciação celular com mudanças fenotípicas, acompanhada de uma queda na contagem numérica das mesmas. Em culturas de células originárias de neuroblastomas, por exemplo, o AMPc aumenta o seu grau de diferenciação (estimulando o surgimento de dendritos) ao mesmo tempo em que diminui o número total de células⁵³. Assim, no nosso estudo poderíamos estar presenciando uma precocidade no brotamento axonal, com um efeito secundário de queda no número total de fibras em regeneração. Caso isto seja verdadeiro, aparentemente não afetaria o resultado funcional final, já que a análise comportamental dos grupos AMPc 28D e CTRL 28D mostraram-se similares.

Outra explicação seria o fato de que no decorrer da regeneração, as múltiplas fibras iniciais presentes nos botões de crescimento vão aos poucos sendo “selecionadas como vencedoras”, aumentando em diâmetro e mielinização para melhorar sua capacidade de condução, sendo perdidas outras como ineficientes^{31,41,48-51}. Komura et al. 1999⁴, analisaram a regeneração neural através da expressão de RNAm da proteína GAP⁴³, a qual participa do crescimento axonal. Encontraram no grupo exposto ao BDNF uma recuperação clínica mais acentuada no 14º dia, acompanhada de uma elevação do RNAm GAP⁴³, enquanto que no 28º dia obtiveram um achado comportamental semelhante entre os grupos controle e BDNF, com expressão do RNAm GAP⁴³ mais elevado no grupo controle nesta fase tardia. Atribuíram este achado ao fato do grupo estimulado pelo fator neurotrófico estar numa fase mais “avançada” de regeneração, na qual a expressão desta proteína já estaria baixa. Em similaridade, poderíamos sugerir que o grupo AMPc 28D estaria realmente mais avançado no processo regenerativo, onde já evidenciaríamos uma etapa além da multiplicação do brotamento, enquanto o CTRL 28D estaria numa fase mais inicial, ainda aumentando em número e não em eficiência suas fibras, já que funcionalmente os dois grupos atingiram resultados comportamentais semelhantes.

Infelizmente, nosso paradigma é limitado e não permite refutar ou aceitar nenhuma destas hipóteses. Mudanças metodológicas como o aumento do tempo de exposição ao AMPc, a sua disponibilização direta e/ou sistêmica aos núcleos centrais do facial, análises histológicas em outros períodos como 21º dia e posteriores ao 28º, e a utilização de métodos de para quantificar a mielinização e o diâmetro de fibras seriam indicados para a continuidade deste estudo.

CONCLUSÃO

Acreditamos haver encontrado evidências comportamentais e histométricas de um papel neurotrófico do AMPc sobre a regeneração do nervo facial de ratos submetidos à transecção total e aproximação por sutura.

REFERÊNCIAS

1. O'Rahilly R. Couro cabeludo e face. In: Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly R. Anatomia: estudo regional do corpo humano. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p.642-9.
2. Choi D, Dunn LT. Facial nerve repair and regeneration: an overview of basic principles for neurosurgeons. *Acta Neurochir (Wien)* 2001;143:107-14.
3. Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in the intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl* 1989;465:1-36.
4. Kohmura E, Yuguchi T, Yoshimine T, Fujinaka T, Koseki N, Sano A, Kishino A, Nakayama C, Sakaki T, Nonaka M, Takemoto O, Hayakawa T. BDNF atelocollagen mini-pellet accelerates facial nerve regeneration. *Brain Research* 1999;849:235-8.
5. Davis L, Perret G, Carroll W. Surgical principles underlying the use of grafts in the repair of peripheral nerve injuries. *Annals of Surg* 1945;121(5):686-98.
6. Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 1951;116:321-62.
7. Hefti F. Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J Neurobiol* 1994;25(11):1418-35.
8. Oliveira JAA, Bernal TMO. Fatores neurotróficos de crescimento. In: Campos CAH, Costa HOO, organizadores. *Tratado de Otorrinolaringologia*. São Paulo: Rocca, 2002. v.1, c.9, p.137-55.
9. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Molecular cell biology*. 2nd edition. New York: Scientific American Books; 1990.
10. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
11. Rall TW, Sutherland EW, Wosilait WD. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts. *J Biol Chem* 1956;218:483-95.
12. Katz AM. Interplay between inotropic and lusitropic effects of cyclic adenosine monophosphate on the myocardial cell. *Circulation* 1990;82(2): 1-7-11.
13. Lerner A, Kim DH, Lee R. The AMPc signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies. *Leuk Lymph* 2000;37(1-2):39-51.
14. Cho-Chung YS, Nesterova M, Becker KG, Srivastava R, Park YG, Lee YN, Cho YS, Kim MK, Neary C, Cheadle C. Dissecting the circuitry of protein kinase A and cAMP signaling in cancer genesis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;968:22-36.
15. Ciardiello F, Tortora G. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 1998;4:821-8.
16. Worley PF, Baraban JM, Snyder SH. Beyond receptors: multiple second-messenger systems in brain. *Ann Neurol* 1987;21(3):217-29.
17. Woods SA, Marmor E, Feldkamp M, Lau N, Apicelli AJ, Boss G, Gutmann DH, Guha A. Aberrant G protein signaling in nervous system tumors. *J Neurosurg* 2002;97:627-42.
18. Wolozin B, Lesch P, Lebovics R, Suderland T. Olfactory neuroblasts from Alzheimer donors: studies on APP processing and cell regulation. *Biol Psychiatry* 1993;34:824-38.
19. Ho PL, Raw I. Cyclic AMP potentiates bFGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol* 1992;150:647-56.
20. Lambeng N, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. The relationship between differentiation and survival in PC12 cells treated with cyclic adenosine monophosphate in the presence of epidermal growth factor or nerve growth factor. *Neurosc Lett* 2001;297:133-6.
21. Piiper A, Dikic I, Lutz MP, Leser J, Kronenberger B, Elez R, Cramer H, Müller-Esterl W, Zeuzem S. Cyclic AMP induces transactivation of the receptors for epidermal growth factor and nerve growth factor, thereby modulating activation of MAP kinase, Akt, and neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* 2002;15:43623-30.
22. Hong Y, York RD, Misra-Press A, Carr DW, Stork PJS. The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem* 1998;273(14):8240-7.
23. Sobue G, Pleasure D. Schwann cell galactocerebroside induced by derivatives of adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 1984;224(4644):72-4.
24. Cheng HL, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-5 in Schwann cell differentiation. *J Cell Physiol* 1997;171:161-7.
25. Nirenberg M, Wilson S, Higashida H, Rotter A, Krueger K, Busis N, Ray R, Kenimer JG, Adler M. Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. *Science* 1983;222(4625):794-9.
26. Melcangi RC, Ballabio M, Magnaghi V, Celotti F. Metabolism of steroids in pure cultures of neurons and glial cells: role of intracellular signaling. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995;53(1-6):331-6.
27. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms of surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9493-8.

28. Bhatt DH, Otto SJ, Depoister B, Fetcho JR. Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science* 2004;305:254-8.
29. Pichichero M, Beer B, Clody DE. Effects of dibutyl cyclic AMP on restoration of function of damaged sciatic nerve in rats. *Science* 1973;182:724-5.
30. McQuarrie IG, Grafstein B, Gershon MD. Axonal regeneration in the rat sciatic nerve: effect of a conditioning lesion and of dbcAMP. *Brain Research* 1977;132:443-53.
31. Gershenbaum MR, Roisen FJ. The effects of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on the degeneration and regeneration of crush-lesioned rat sciatic nerves. *Neurosci* 1980;5:1565-80.
32. Kilmer SL, Carlsen RC. Chronic infusion of agents that increase cyclic AMP concentration enhances the regeneration of mammalian peripheral nerves in vivo. *Exp Neurol* 1987;95:357-67.
33. Borin A, Toledo RN, Faria SD, Testa JRG, Cruz OLM. Modelo experimental comportamental e histológico da regeneração do nervo facial em ratos. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72(6):776-85.
34. Appenzeller O, Palmer G. The cyclic AMP (adenosine 3'5'-phosphate) content of sciatic nerve: changes after crush. *Brain Res* 1972;42:521-4.
35. Black MM, Lasek RJ. Slowing of the rate of axonal regeneration during growth and maturation. *Exp Neurol* 1979;63:108-19.
36. Kilmer SL, Carlsen RC. Forskolin activation of adenylate cyclase in vivo stimulates nerve regeneration. *Nature* 1984;307:455-7.
37. Rall TW. Formation and degradation of cyclic nucleotides: an overview. In: Nathanson JA, Keibarian JW. *Cyclic nucleotides*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1982. v.58/I, c.1, p.3-16.
38. Roisen FJ, Murphy RA, Braden WG. Neurite development in vitro. I. The effects of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate. *J Neurobiol* 1972;3(4):347-68.
39. Guntinas-Lichius O, Streppel M, Angelov DN, Stennert E, Neiss WF. Effect of delayed facial-facial suture on facial nerve regeneration: a horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997;117:670-4.
40. Barrs DM. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *Laryngoscope* 1991;101:835-48.
41. Wong BJJ, Mattox DE. The effects of polyamines and polyamine inhibitors on rat sciatic and facial nerve regeneration. *Exp Neurol* 1991;111:263-6.
42. Jones KJ. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurology* 1993;121:133-8.
43. Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Lauretti L, Bozzini V, Sbriccoli A. Reconstruction of peripheral nerves: the phenomenon of bilateral reinnervation of muscles originally innervated by unilateral motoneurons. *Neurosurg* 1992;30(3):364-9.
44. Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Lauretti L, La Marca F. Qualitative, morphological, and somatotopic nuclear changes after facial nerve regeneration in adult rats: a possible challenge to the "no new neurons" dogma. *Neurosurg* 1995;37(3):456-63.
45. Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E, Stennert E. Qualitative image analysis of the chromatolysis in rat facial nerve and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res* 1996;286:537-41.
46. Semba K, Egger MD. The facial "motor" nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comparative Neurol* 1986;247:144-58.
47. Yian CH, Paniello RC, Spector JG. Inhibition of motor nerve regeneration in a rabbit facial nerve model. *Laryngoscope* 2001;111:786-91.
48. Chen Y-S, Hsu C-J, Liu T-C, Yanagihara N, Murakami S. Histological rearrangement in the facial nerve and central nuclei following immediate and delayed hypoglossal-facial anastomosis. *Acta Otolaryngol* 2000;120:551-6.
49. Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope* 1997;107:992-9.
50. Hildebrand C, Mustafa GY, Waxman SG. Remodelling of internodes in regenerated rat sciatic nerve: electron microscopic observations. *J Neurocytol* 1986;15:681-92.
51. Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Tomov TL, Dramiga J, Neiss WF, Wewetzer K. Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp Neurol* 2001;172:70-80.
52. Byers JM, Clark KF, Thompson GC. Effect of pulsed electromagnetic stimulation on facial nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:383-9.
53. Friedman DL. Regulation of the cell cycle and cellular proliferation by cyclic nucleotides. In: Nathanson JA, Keibarian JW. *Cyclic nucleotides*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1982. v.58/II, c.18, p.157.